

# ナノスケール空間に閉じ込められた生体分子の物理的性質を実測

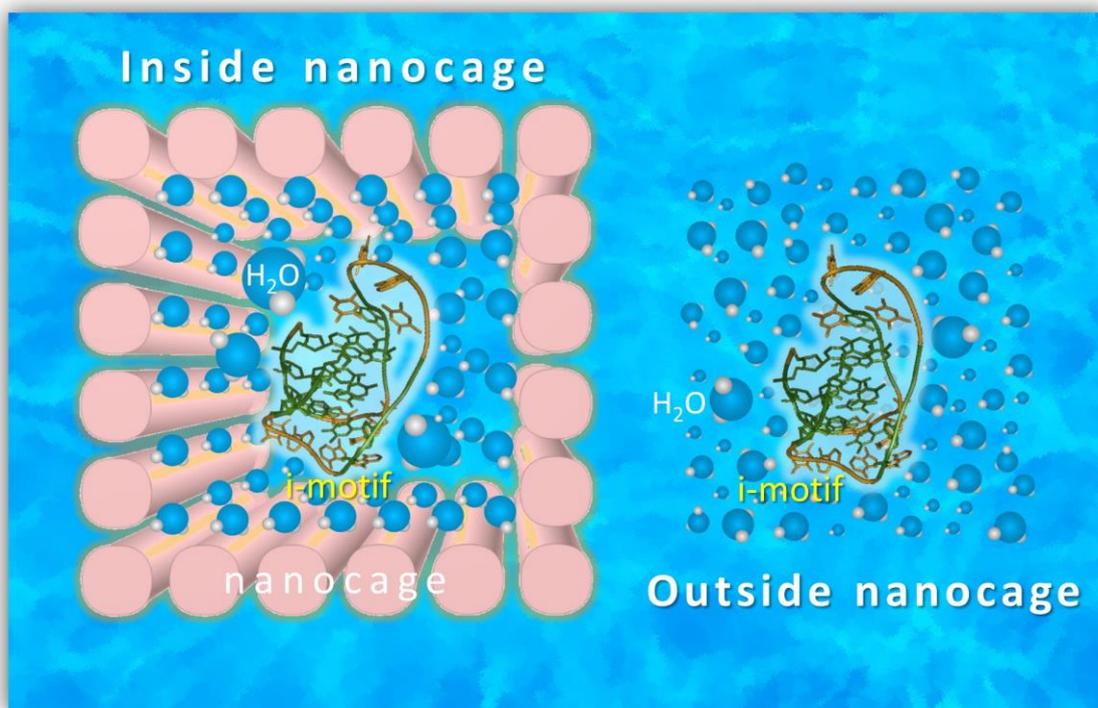
## —狭小空間での水分子の物性の変化が与える影響を説明—

### 概要

京都大学大学院理学研究科 遠藤政幸 特定准教授（物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) 連携准教授)、杉山弘 同教授 (iCeMS 連携 PI)、ケント州立大学ハンビン・マオ (Hanbin Mao) 教授の研究グループは、DNA によってナノスケールの立体空間を作成し、その中に、DNA 構造の1つである i-モチーフ構造<sup>\*1</sup> やグアニン四重鎖構造<sup>\*2</sup> を配置することで、これらの構造体が熱力学的に極めて安定化することを見出しました。さらに、この要因が空間内での水分子の物理的な性質に影響されていることを明らかにしました。

当研究グループでは、特定のサイズのナノスケールの空間（ナノケージ）に生体分子を閉じ込めると、熱力学的に安定化することを実験的に明らかにしていました。しかしながら、その現象が何によって引き起こされるかわかっていませんでした。今回の研究では、生体分子がほどけるときの水分子の影響に着目し、空間の広さが制限されることで、空間内部の水分子の活量が低下することを系統的に明らかにしました。生体分子の安定性に影響を与えるこれらの空間は人工的にデザインできるため、生体分子の反応場である空間内部の環境の再現や、その内部での多様な生体分子の安定性や折り畳みについても知見が広がると期待されます。

本成果は、2018年9月4日に米国の国際学術誌「米国科学アカデミー紀要」にオンライン掲載されました。



溶液中の水分子は自由に動き回るが、ナノケージ中の水分子は有限の空間にあるためにより秩序だ  
って配置されその動きも制限されると考えられる。そのため、水分子に囲まれた生体分子の安定性  
に影響を与え、ナノケージ中の生体分子はより安定化する。

## 1. 背景

サイズが制限されたナノスケールの空間内で分子は特異な性質を示します。例えば、「シャペロニン」と呼ばれる空洞を持つタンパク質では、間違っただけに折り畳まれたペプチドやタンパク質がその空洞を利用して、正しく折り畳み直されることが知られています。空間の大きさが分子に近いサイズ（数ナノメートル）であることが、閉じ込められた分子の構造や反応性に影響を与えていると考えられますが、これまではそれを明確に実証するための方法がありませんでした。

本グループでは、以前、DNA オリガミ<sup>\*3</sup>によって作成した角筒状の構造体（ナノケージ）を利用して、大きさの制限された空間内でのグアニン四重鎖（DNA 構造の 1 つ）の安定性や形成に対する効果を検討しました。その結果、このようなナノスケールの空間では折り畳まれた生体分子の構造の安定性が増加することを見出しました（Nature Nanotechnology 2017, 12, 582）。しかしながら、空間内でどのような要因が影響して、分子の安定化が起こるのかについては不明なままでした。今回の研究では、その要因である水分子が生体分子の折り畳みに与える影響について詳細に検討し、空間内では水分子の物理的な性質が大きく変化し、生体分子の安定性に大きな影響を与えていることを明らかにしました。

## 2. 研究手法・成果

本研究では、i-モチーフ構造がほどけて 1 本鎖 DNA になる現象（アンフォールディング）と 1 本鎖 DNA がこの DNA 構造に再び折り畳まれる現象（フォールディング）を DNA オリガミで作成したナノサイズの「ケージ」に入れ、大きさの制限されたナノスケール空間を実験的に再現し、その中での i-モチーフ構造の安定性について検討しました（図 1）。実験方法は光ピンセット<sup>\*4</sup>でナノケージ内に入れた i-モチーフ構造を両側から引っ張ることで、アンフォールディングした時の変位（DNA 鎖の伸びの距離）とその際にかかる力（アンフォールディング力）を測定していきました。

### 1) ナノケージ内への i-モチーフ構造の導入と測定系の構築

まず、この研究のポイントとなるサイズの異なるナノケージを DNA オリガミ法によって 4 種類デザインしました。ナノケージの構造は長さが 50 ナノメートル（nm）の角筒状の中空構造で、ここでは、図 1 C のように最小型、小型、中型、大型のナノケージと呼び、それぞれ内側は 6×6 nm、9×9 nm、12×12 nm、15×15 nm です。

この測定法では、ビーズの位置の変位（DNA 鎖の伸び）に対してターゲット分子にかかる力を測定でき、力-変位曲線を得ることができます。この方法を用いて i-モチーフ構造 1 分子にかかる力と変位を測定し、そのデータを集めます。実験では、ナノケージをそのままの構造に保ちながら、i-モチーフ構造に機械的な力を加え、ナノケージ内での安定性と折り畳みやほどける過程への影響を調べました。

### 2) ナノケージ内での pH に対する i-モチーフ構造の安定性

まず、小型のナノケージ（9×9 nm）を使って、i-モチーフ構造の安定性に対する pH の影響を測定しました。i-モチーフは 2 つのシトシン塩基間に水素イオン（H<sup>+</sup>）を介して結合します。このため、酸性側の pH で構造を安定に形成できます。

pH 5.5 で測定を行うと、折り畳まれた状態の i-モチーフ構造をアンフォールディングするのに、ナノケージがない場合、必要な変位は 8.0 nm、必要な力が 25.3 pN（ピコニュートン）であったのに対し、小型のケージに入れた場合は、アンフォールディングに必要な変位は 7.8 nm、必要な力が 35.5 pN と測定できました。ア

ンフォールディングの変位はほぼ同じであることから、小型のナノケージ内ではケージなしの場合と同様に i-モチーフ構造を形成していることが分かりました。一方で、小型ケージ内で折り畳まれている i-モチーフ構造をアンフォールディングするとき、ケージがない場合に比べると、引っ張る力の強さが約 10 pN 増加し、小型のケージに入れることで、i-モチーフ構造の機械的な（物理的な力に対する）安定性が大幅に増加したことを示しています。

一方、pH 6.0 では、ナノケージ中での i-モチーフ構造は 90%以上安定に形成されるのに対して、ケージなしでは形成が 20%程度であることが分かりました。つまり、ナノケージ中は外部よりもより酸性になって i-モチーフ構造の形成を助けていることが示唆されました。また、より中性 (pH7.0) に近い pH6.5 では、i-モチーフの形成は見られませんでした。

### 3) ナノケージのサイズに対する i-モチーフ構造の安定性

次に、空間のサイズに対する i-モチーフ構造の安定性を検討しました。4 つのサイズの異なるナノケージを使って、i-モチーフの安定性を pH5.5 で測定しました (図 2)。広めの 3 つのサイズのナノケージは、ケージなしの i-モチーフ構造のアンフォールディングと同様に約 8 nm の変位が見られました (図 2 A)。一方で、最小型のナノケージ (6×6 nm) では変位が 4.8 nm で完全に折り畳まれていないことが分かりました。つまり、狭いナノ空間そのものが i-モチーフ構造の形成に直接影響を及ぼしたことになります。

広めの 3 つのサイズのナノケージに対して、アンフォールディングに必要な力の測定を行いました (図 2 B)。大型 (15×15 nm)、中型 (12×12 nm)、小型 (9×9 nm) のナノケージ内ではそれぞれ 27.5 pN、31.3 pN、35.5 pN とケージのない状態 (25.4 pN) より安定で、サイズが小さくなるにしたがって安定性が増加することが分かりました。このことは、ナノケージのサイズによって、内部の i-モチーフ構造の機械的な安定性が変化し、より狭いケージの中では i-モチーフ構造の安定性が増すことが分かりました。小型 (9×9 nm) のナノケージによって安定化されるエネルギーは 4.2 kcal/mol と大きく、ナノ空間に置かれるだけで i-モチーフ構造は熱力学的に大きく安定化されることが分かりました (図 2 C)。

### 4) ナノ空間内での i-モチーフ構造の折り畳みに対する水分子の影響

ここまで、検討してきたナノケージのサイズに対する i-モチーフ構造の安定性は、ケージがより狭くなるとより安定化するという結果でしたが、この原因はどこにあるのでしょうか。私たちは、折り畳まれた i-モチーフ構造がアンフォールドするときの水分子の結合に着目しました。このため、空間の内部に存在する水分子の物理的な性質を実験によって調べることにしました。まず、以前に行われたグアニン四重鎖構造の折り畳みの際に放出される水分子の数から、9×9 nm、12×12 nm、15×15 nm のナノケージ内の水の活量（実効的な濃度）を見積もりました (図 2D)。この結果、ナノケージのサイズが減少するにしたがって水の活量が減少することが分かりました。9×9 nm のナノケージでは、分子クラウディングに用いられるポリエチレングリコール (PEG) のような通常の共溶媒が到達できる範囲を超えて水の活量が低下することもわかりました。この実験で得られたそれぞれのナノケージ内での水の活量から、i-モチーフ構造がアンフォールドするときに必要な水分子を約 57 分子と見積もることができました。

これらの結果から、ナノケージのサイズを小さくすると水の活量が減少することが分かりました。この一連のナノケージを用いて、i-モチーフ構造及びグアニン四重鎖構造の折り畳みの過程全体での水分子の変化を見ることができました。折り畳みによって水分子が失われるため、i-モチーフ構造の折り畳みは水の活量が低下したナノケージ中でより促進されることが分かりました。ナノケージ内部では、水分子は制限された空間に閉

じ込められ、より秩序だった配置をとると考えられるため、これが水の活量の低下という物性になって表れると考えられます。

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究の成果は、「自由にデザインできるナノスケール空間」を使った、分子の物性や反応性を調べることのできる最先端の研究であり、ナノスケールの狭小空間内部での生体分子の振る舞いを解き明かすことができました。なぜ狭小な空間に入った生体分子が大きく安定化されるのかなどの問題が、水分子の物性の変化という観点から実験的に明らかにされました。今後は、ナノ空間内で、より複雑な RNA 構造体やペプチド、タンパク質の安定性や折り畳みについても知見が得られることが期待されます。近年ではカーボンナノチューブ内に閉じ込められた水分子が 100 °C でも固体であるといった現象が見出されています(Nature Nanotechnology, 2017, 12, 267)。こうした自由に設計・構築できる分子サイズのナノ空間を使うことで、今まで思いもよらなかった新しい現象がこれからも発見されてくるでしょう。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、独立行政法人日本学術振興会 (JSPS) の国際共同研究事業 国際化学研究協力事業、および、文部科学省科学研究費助成事業の新学術領域研究「分子ロボティクス」、基盤研究(S)、基盤研究(B)、挑戦的萌芽研究の支援を受けて行われました。

#### <用語解説>

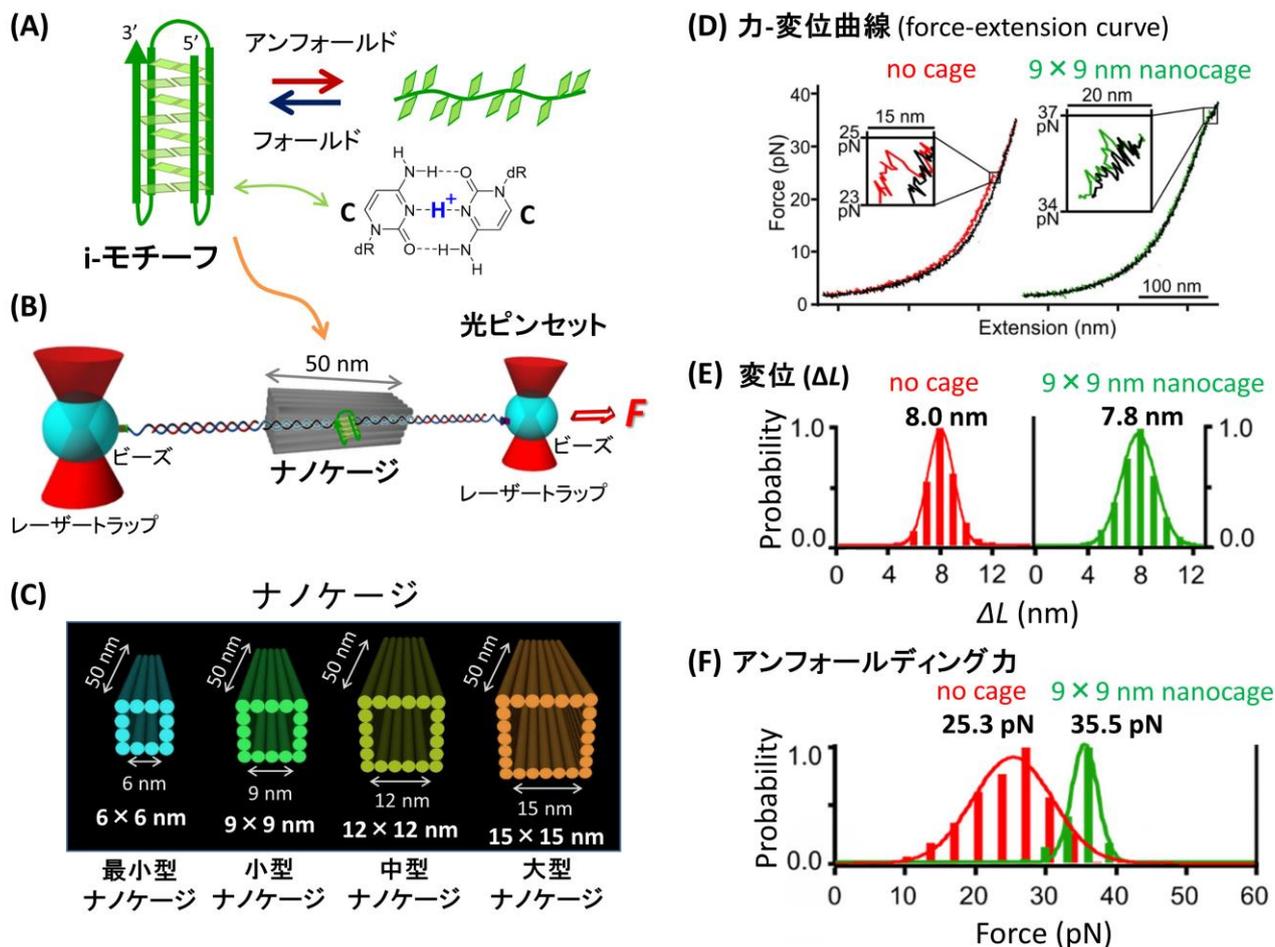
- \*1 **i-モチーフ(i-motif)** : シトシン塩基の繰り返し配列からなり、2つのシトシン塩基が水素イオンを介した水素結合で結合する対構造(C-H<sup>+</sup>-C)で、4本の DNA 鎖が折り畳まれた構造をとる。グアニン四重鎖に相補的な配列でもある。今回の研究ではヒトテロメア由来の i-motif TAA(CCCTAA)<sub>4</sub> を使用している。
- \*2 **グアニン四重鎖 (G-quadruplex)** : グアニン塩基の繰り返し配列からなり、グアニン 4 塩基が水素結合を介して平面に結合する構造 (G カルテット) で、金属イオンを介して G カルテットが数個重なった構造をとる。染色体の末端に存在しテロメラーゼによって配列が伸長され、がん化に関連している。今回の研究ではヒトテロメア配列 TTA(GGGTTA)<sub>4</sub> を使用している。
- \*3 **DNA オリガミ (DNA origami)** : DNA の自己集合によって作成されるナノ構造体。2006 年にカリフォルニア工科大学の Paul Rothemund (ポール・ロスムンド) 博士によって開発された。この方法を使うことであらかじめ設計した 2 次元および 3 次元 DNA ナノ構造体を作成することができる。
- \*4 **光ピンセット(optical tweezers)** : 光を回折限界まで収束させることで、水溶液中でその集光点に微粒子を捕捉する方法で、その集光点を移動させることで微粒子を 3 次元に操作することができる。通常レーザーを光源に用い、集光点に微粒子を捕捉するため、レーザートラッピングとも呼ばれる。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル : Decreased water activity in nanoconfinement contributes to the folding of G-quadruplex and i-motif structures (水の活量の減少が制限された空間でのグアニン四重鎖と i-モチーフの形成を促進する)

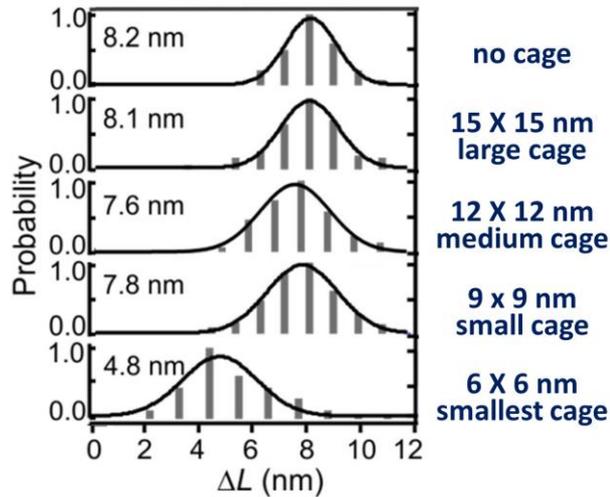
著者 : Sagun Jonchh , Shankar Pandey, Tomoko Emura, Kumi Hidaka, Mohammad Akter Hossain, Prakash Shrestha, Hiroshi Sugiyama,\* Masayuki Endo,\* Hanbin Mao\*

<参考図>

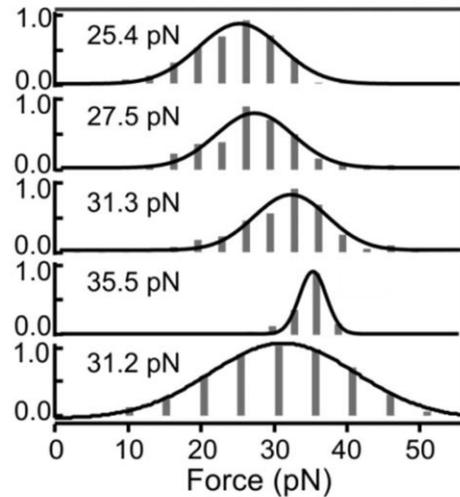


**図 1.** ナノケージ(ナノ空間)中での i-モチーフ構造の安定性の測定。(A) i-モチーフ構造：シトシンの連続した 4 本の DNA 鎖が折り畳まれて形成される。2 つのシトシンから形成される C-H<sup>+</sup>-C ペアが交互に対形成する。シトシン-シトシン間の中心に水素イオン(H<sup>+</sup>)が結合している。(B) 光ピンセットと測定系：ケージ内に配置した i-モチーフ構造の両側に長鎖の 2 本鎖 DNA 鎖を結合し、さらにビーズを結合することで、光ピンセットの集光点に固定した。ビーズを移動させることで、ナノケージ内部のグアニン四重鎖を引っ張り、ケージ内での i-モチーフ構造のアンフォールディング・フォールディングを操作し、それに伴う力測定を行った。実験ではナノケージ内に導入した i-モチーフの 1 本鎖 DNA へのほだけ (アンフォールディング) と折り畳み (フォールディング) を観察する。(C) 実験に使用した角筒状のナノケージは四種類のサイズ。(D) 光ピンセットを使った力-変位曲線の測定。DNA 鎖を伸張していくことで、アンフォールディングが起こり、その時の変位とかかる力を計測する。また力を緩和していくと i-モチーフ構造は再びフォールディングする。(E)(F) 変位とアンフォールディング時にかかる力のヒストグラム。ナノケージなし (no cage; 赤色) と小型ナノケージ (9 × 9 nm; 緑色) 内の i-モチーフ構造の変位とアンフォールディング時にかかる力のヒストグラム。

(A) 変位 ( $\Delta L$ )



(B) アンフォールディング力



(C) i-モチーフのナノケージ内での安定性

nanocage	$\Delta G_{\text{unfold}}$ (kcal/mol)
no cage	$7.10 \pm 0.48$
15 X 15 nm	$7.78 \pm 0.80$
12 X 12 nm	$8.50 \pm 0.91$
9 X 9 nm	$11.3 \pm 0.99$

(D) ナノケージ内での水分子の活量

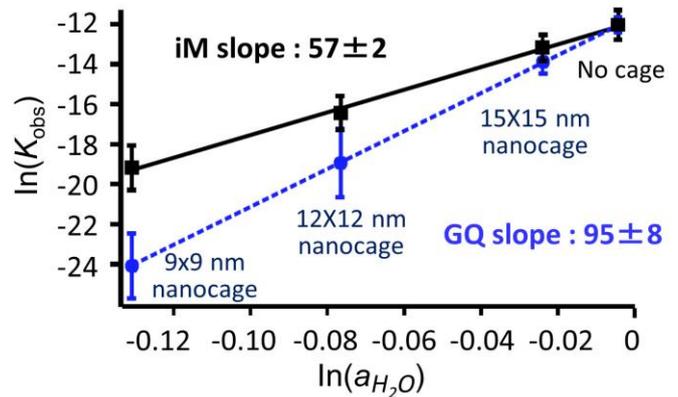


図 2. ナノケージ内に導入した i-モチーフ構造の物性の測定。(A)(B) 4 つサイズの異なるナノケージに導入した i-モチーフ構造の変位とアンフォールディング時にかかる力のヒストグラム。(C) ナノケージに導入した i-モチーフ構造の熱力学的安定性。(D) 3 つの異なるサイズのナノケージ内部の水の活量( $a_{\text{H}_2\text{O}}$ )。グアニン四重鎖(GQ)の平衡定数( $K_{\text{obs}}$ )とアンフォールディングに必要な水分子の数から見積もった。得られたそれぞれのナノケージでの水の活量から i-モチーフ(iM)のアンフォールディングに必要な水分子の数を算出した。